Chinese Agron. J. 7 : 87-93 (1997)
Chinese Society of Agronomy © 1997

當歸組織培養之研究
(II) 培養方式對懸浮細胞形成體胚之影響

黃漢龍[1] 陳忠川[1] 陳威臣[2] 蔡新聲[2]

[1]中國醫藥學院 [2]台灣省農業試驗所

摘要：當歸*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels載於本經中品，自古即為我國之重要藥材，其功用甚廣，應用於許多中醫方劑，主治婦人疾患。台灣以往未曾有正統川歸之栽培，倘能將正統川歸引種台灣妥為發展，對我國因應加入世界貿易組織，規劃農民種植及對我大力推展科學化中藥之努力應具有正面意義。引種首需繁殖相當數量之苗木以供不同地區及海拔之試種栽培。本研究乃探討以當歸之未成熟胚建立大量繁殖的可行性。結果顯示，當歸未成熟胚於MS基礎培養基中培養一個月後，可形成擬胚化癒合組織、正常植物體及不正常植物體三種材料。擬胚化癒合組織於液體MS基礎培養基中，可形成懸浮細胞及細胞團塊而繼續生長增殖，並進一步發育成體胚及小苗。懸浮細胞於較慢的振盪速度(80 rpm)與較大的培養密度(2.5 ml PCV / 25 ml medium)下生長增殖較快；振盪速度為100 rpm及較低的培養密度(0.2 ml PCV / 25 ml medium)則有利於懸浮細胞形成體胚及小苗。

關鍵詞：當歸、未熟胚培養、擬胚化癒合組織、細胞懸浮培養。

Studies on tissue culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. (II) Influence of culture methods on somatic embryos formation from culture suspension cell.

Han-Lung Huang[1], Chung-Chuan Chen[1], Uei-Chin Chen[2] and Hsin-Sheng Tsay[2]

[1]Institute of Chinese Pharmaceutical Science, China Medical College, Taichung, 40421, Taiwan.

[2]Department of Agronomy, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung, 41301, Taiwan.

Abstract. *Angelica sinensis* has been used widely to cute women's peculiar disease in China. Because of its broad pharmacological effects, it has been adopted in a lot of traditional Chinese medicinal prescription. The purpose of this study is to find the possibility to mass-propagate *A. sinensis* by developing its immature embryos. It was found that the embryogenic callus, normal plantlets and abnormal plantlets could be induced from immature embryos cultured on MS basal medium for one month. When embryogenic callus was cultured in liquid MS medium, it formed suspension cells and the cell clumps were keeping

on growing and developing further into somatic embryos and seedlings. The suspension cells grew faster when they were cultured under slower shaking speed (80 rpm) and higher culture density (2.5 ml PCV / 25 ml medium, PCV = packed cell volume). When the shaking speed was at 100 rpm and the culture density was lower (0.2 ml PCV / 25 ml medium), the suspension cells were more easily to form somatic embryos and seedlings.

Key words: Angelica sinensis, immature embryo culture, embryogenic callus, suspension cell culture.

前　言

當歸*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels載於本經中品，歷代本草均有著錄，自古即爲我國之重要藥材。古人以爲當歸之名源自其藥能，可使「氣血各有所歸」。婦女以血爲本，因「當歸調血」故爲「婦人要藥」，能「補女子諸不足」(Tang 1249, Lee 1593, Lai 1976)。用於治療一切血症、咳逆上氣、溫中止痛及諸惡瘡瘍，亦可作爲潤腸劑和強壯劑。歷代本草所載當歸的功用，許多已由現代的實驗藥理學得到證實(Mei 1983)。

植物組織培養大量繁殖技術已被廣泛的應用在種苗生產事業。Ku (1982)由葉柄誘得之癒合組織經器官分化(organogenesis)可得到當歸植物體。Zhang *et al.* (1989)則由根誘得之癒合組織經擬胚化(embryogenesis)培養可得到當歸植物體。Ammirato *et al.* (1983)指出，擬胚化培養較器官化培養節省許多人力及物力，是值得開發的繁殖途徑。而Huang *et al.* (1996)報導了適合當歸誘導擬胚化癒合組織及其生長的方法。本研究以當歸離體未成熟胚(excised immature embryo)培養所形成之擬胚化癒合組織爲材料，嘗試建立當歸擬胚化細胞懸浮培養，並探討當歸懸浮細胞培養及形成體胚的最適條件，期能誘得大量體胚並形成正常植株，爲當歸大量繁殖提供另一途徑。

材料與方法

一、材料：

本研究使用之材料，係原產於甘肅之中國當歸*Angelica sinensis* (Oliv.) Diels（簡稱川歸或秦歸）未成熟胚，經由MS (Murasige & Skoog 1962)培養基誘導形成之擬胚化癒合組織(Huang *et al.* 1966)。

二、方法：

㈠培養基的配製：

1.固體培養基：本研究主要以MS無機鹽類及有機成分爲基本配方，且內含3%蔗糖及0.9%洋菜。培養基加入洋菜前先用1N NaOH及HCl將pH值調至5.7±0.1，然後以121°C、1.05 kg/cm^2 (15 lb/in^2)高壓滅菌15分鐘後，擺成斜面放冷備用。

2.液體培養基：配製步驟同固體培養基，惟pH值調至5.2±0.1，且不添加洋菜。

㈡培養環境：

接種後，將材料置於25±1°C之恆溫照光（固體培養約2,000 lux；液體培養約200 lux）下培養，另液體培養則將材料置於水平迴轉式振盪器上以100 rpm之速度振盪培養。

㈢當歸擬胚化細胞懸浮培養之建立：

由未成熟胚培養所誘導之擬胚化癒合組織，可藉以建立擬胚化細胞懸浮培養。取約0.5 g之擬胚化癒合組織，經細切後培養於含25 ml液體培養基之125 ml三角瓶中，三星期後過濾去除大團粒之細胞，利用細團粒建立懸浮細胞，此懸浮細胞每三週繼代培養一次，以作爲懸浮培養及誘導體胚形成試驗之材料。懸浮培養細胞之增殖，係測量於含25ml

培養基之125ml有臂三角瓶中細胞沉降體積(packed cell volume, PCV)來表示；懸浮細胞形成體胚及植物體之數量，則係於25 ml培養材料中，經均勻振搖後，吸取1 ml計算所含體胚及植物體之數量，以估計25 ml培養液所含體胚及植物體之總量。

㈣統計方法

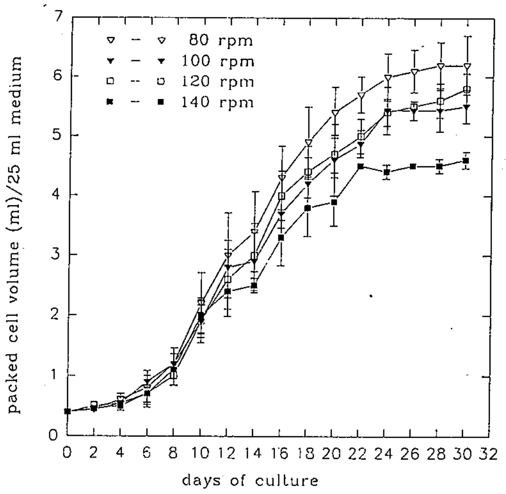

Fig 1. Growth curve of suspension cell of *A. sinensis* cultured in different shaking speed. Culture condition : same as Table 1.

試驗所得資料經變方分析後，若處理間差異顯著，則利用Duncan's multiple range test測定比較各處理平均值間之差異。

結 果

一、振盪速度對當歸懸浮細胞增殖之影響

將懸浮細胞於不同振盪速度下進行試驗，且分別於處理後10、20及30天調查細胞增殖情形。結果如圖1所示，經過10天的液體培養，不同的振盪速度對細胞增殖並無顯著影響，而在第20天及第30天時則PCV有明顯的差異。第30天的結果顯示，80 rpm的振盪速度最適於懸浮細胞的增殖，100及120 rpm次之，140 rpm最差。懸浮細胞之生長曲線如圖1所示，起始細胞體積PCV爲0.4 ml/25 ml，大約於培養25天後漸漸接近細胞增殖的靜止期(stationary phase)，因此繼代培養時間應以到達靜止期（25天）前較爲適宜。

二、振盪速度對當歸懸浮細胞形成體胚之影響

將懸浮細胞於不同振盪速度下進行試驗，於第30天調查體胚及小苗的數量。結果如表1所示，當

Table 1. Influence of shaking speed on the formation of somatic embryos from suspension cell of *A. sinensis**

Shaking speed -rpm-	No. of somatic embryo produced per flask**	No. of seedling produced per flask**
80	43.68c***	21.44b***
100	106.25[a]	48.21[a]
120	75.00[b]	10.71[b]
140	50.00[c]	10.71[b]

* Basal medium: MS salts supplemented with 3% sucrose and pH = 5.2. The suspension cell was filtered by 30 mesh (0.59 mm) before culture and the initial packed cell volume (PCV) of suspension cell in 125 ml flask contained 25 ml liquid basal medium was about 0.4 ml.

** Data collected from suspension cell which was cultured for 30 days. Only seedling size between 2-5 mm were counted. Each value is mean of at least 5 replications.

*** Means in each vertical column followed by same letter are not significantly different at 5% level using Duncan's multiple range test.

振盪速度為100 rpm時形成體胚及大小約2～5 mm之小苗的數量最多，因此100 rpm是促使懸浮細胞形成體胚及小苗的適當振盪速度。

三、細胞密度對當歸懸浮細胞之影響

將不同起始體積之懸浮細胞置於相同大小的容器中，以100 rpm之速率進行液體培養，30天後調查體胚及小苗的數量。結果如表2所示，以起始體積PCV為0.2 ml之增殖效果最佳，而細胞密度越大越不利於懸浮細胞形成體胚及小苗。液體培養不同細胞密度之生長曲線如圖2所示，當起始培養之PCV為2.5 ml時，細胞增殖之靜止期較早出現，約需14天，而起始PCV低於2.5 ml者約需培養25天後才逐漸接近靜止期。

四、細胞大小對當歸懸浮細胞形成體胚之影響

利用篩網將懸浮細胞區分為三種不同大小之材料，以100 rpm之速率進行液體培養，30天後調查體胚及小苗的數量。結果如表3所示，細胞大小對當歸懸浮細胞形成體胚與小苗的數量並無顯著影響，但是觀察懸浮細胞團塊(cell clump)之大小則有明顯的差異，結果顯示經培養21天後細胞團塊有偏大的現象，表示細胞團塊的大小似乎與培養日期有關。試驗結果亦指出，這些變粗的細胞團塊無法直接發育形成植物體，它們的發展似乎是首先在其表面形成球狀的胚狀體(embryoids)，有些胚狀體能發育成體胚最後形成小苗，有些胚狀體無法形成體胚則又形成細胞團塊而逐漸變大（資料未列）。

此外，將當歸再生之幼小植物體培養於含有1 ppm kinetin及0.01 ppm NAA之液態MS培養基，在100 rpm振盪培養60天後，也能自下胚軸產生大量的小苗（圖3）。

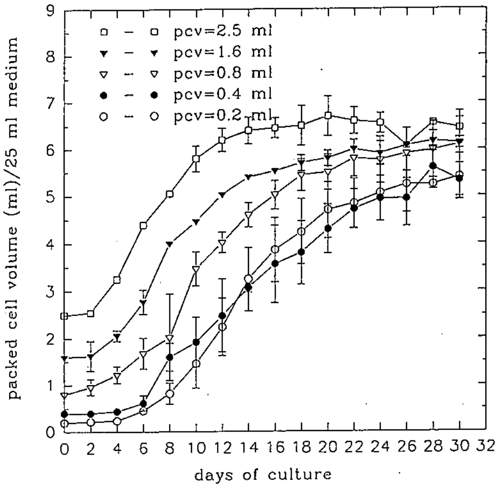

Fig 2. Growth curve of suspension cell of *A. sinensis* cultured in different initial cell density. Culture condition : same as Table 2.

Table 2. Influence of cell density on the formation of somatic embryos from suspension cell of *A. sinensis**

Initial PCV -ml-	No. of somatic embryo produced per flask**	No. of seedling produced per flask**
0.2	343.75a***	207.50a***
0.4	147.92b	55.00b
1.0	108.34bc	27.50c
1.6	75.00c	17.50c
2.5	62.50c	2.00c

* Basal medium : MS salts supplemented with 3 % sucrose and pH = 5.2. The suspension cell was filtered by 30 mesh (0.59 mm) before culture and shaking speed was 100 rpm.

** Same as Table 1.

*** Same as Table 1.

Table 3. Influence of cell clump size on the formation of somatic embryos from suspension cell of *A. sinensis**

Cell clump size** -mm-	No. of somatic embryo produced per flask****	No. of seedling produced per flask****
0.840	216.75[a]***	162.50[a]***
0.590	233.25[a]	112.50[a]
0.297	208.25[a]	133.25[a]

* Basal medium : MS salts supplemented with 3 % sucrose and pH = 5.2. The initial packed cell volume of suspension cell was about 0.2 ml and shaking speed was 100 rpm.

** The size of suspension cell clump filtered by 20 mesh was about 0.84 mm, filtered by 30 mesh was about 0.59 mm and filtered by 50 mesh was about 0.297 mm.

*** Same as Table 1.

**** Data collected from suspension cell which was cultured for 21 days.

Fig 3. Many plantlets produced from hypocotyl of *A. Sinensis*, cultured in MS liquid medium containing 1 mg/l kinetin and 0.01 mg/l NAA, under sharking speed (100 rpm) for 60 days.

討 論

Sharp et al. (1980)指出植物組織培養擬胚化構造的產生可分爲直接和間接兩種，前者由培殖體直接誘得體胚，後者則先由培殖體誘得癒合組織後再由癒合組織形成體胚。將當歸未成熟胚置於MS基礎鹽類培養基，不需任何植物生長調節劑的刺激便能形成擬胚化癒合組織、正常及不正常的植物體，而其根、葉柄及未成熟胚亦可誘導形成擬胚化癒合組織(Huang 1996, Ku 1982, Zhang 1989)。許多報告指出，擬胚化癒合組織培養於液體培養基較有利於體胚的形成(Ammirato 1983, Durham & Parrott 1992, Laine *et al*. 1992)。液體培養中所形成大小不等的懸浮細胞及體胚，可利用過篩的方式加以分離，以得到較爲均質化的材料，利用此均質化的材料則可進行後續製作人工種子之試驗。Sulaiman *et al*. (1991)報導*Meconopsis simplicifolia*的癒合組織培養於液體培養基，其體胚形成率可達80-85%。本試驗也有類似的結果，擬胚化癒合組織培養於液體培養基2-3週後，體胚的形成率可高達100%。

一般細胞懸浮培養之振盪速度約在50-150 rpm之間，Steward *et al*. (1958)報導液體培養的振盪速度會影響胡蘿蔔細胞的生長，轉速較快使得細胞與培養基接觸及與空氣交換之機會較多生長較旺盛，轉速較慢則有助於細胞進一步分化成體胚。本研究亦顯示振盪速度對當歸懸浮細胞的生長及體胚與小苗的形成有顯著的影響，當振盪速度爲80 rpm時，於第20及30天時可得到較大的PCV。而細胞大小對體胚及小苗數量的影響試驗顯示，較大的團塊是培養較久且較老的細胞，此結果是否暗示較大的PCV僅是較大的懸浮細胞團塊，而非較多的懸浮細胞團

塊，則有待進一步試驗證實。而懸浮細胞於100 rpm振盪速度形成的體胚及小苗的數量最多，過慢(80 rpm)或過快（120及140 rpm）的振搖速度均不利於體胚及小苗的形成，這可能是由於懸浮細胞於慢速的振盪下快速增殖，使其密度增加而妨礙細胞進一步的發育成體胚及小苗；或在高速的振盪下，細胞間或細胞與玻璃壁間的嚴重撞擊，導致細胞受損而無法進一步分化成體胚及小苗所致。因此，當歸懸浮細胞生長及體胚誘導應以100 rpm的振盪速度較爲適宜。Halperin (1967)指出液體培養的細胞密度會影響體胚的成熟。Ammirato (1983)也提出低密度下培養有利於體胚的成長和成熟。Yamamoto and Yamada (1986)則指出*Rauwolfia serpentina*的細胞初體積會影響細胞生長曲線，並認爲高密度之細胞培養，容易因培養基養分的快速耗盡與細胞間的相互作用所傷害。本研究亦顯示細胞密度會影響當歸體胚及小苗的形成，細胞密度越低(0.2 ml PCV/25 ml medium)越有利於體胚及小苗的形成，此結果與前人研究相似。

Hall (1991)指出建立懸浮細胞初期，可藉由篩網來篩選粗細不一的細胞，且當懸浮細胞之內徑爲0.5-1.0 mm的大小時，較能快速吸收培養基的養分而生長。本研究結果顯示，細胞大小（約0.30-0.84 mm）對當歸懸浮細胞形成體胚與小苗的數量並無顯著影響，而培養21天後的懸浮細胞團塊有偏大的現象，較大的團塊應該是培養較久且較老的細胞，而較小的團塊則是較年輕的細胞所形成。

根據本研究結果，100 rpm之振搖速度較有利於當歸擬胚狀懸浮細胞培養，而利用低密度(0.2 ml PCV/25 ml medium)並配合100 rpm之振搖速度的培養方式，對於體胚及小苗的誘導應可得到較大的效果。雖然，細胞大小對於體胚及小苗的誘導並無影響，而就試驗的精確度而言，理應利用篩網區分懸浮細胞的大小，而得到較均質化的材料以進行試驗。利用上述之液態培養條件可得到較佳且大量的懸浮細胞、體胚及小苗，利用篩網區分懸浮細胞及體胚的大小，而得到較均質化的材料以進行試驗，而體胚則可進一步做爲製作人工種子之材料，未來應可利用此方式建立當歸之大量繁殖系統。

誌謝：本研究承國科會經費補助（計畫編號：NSC85-2321-B055-04），特此申謝。

引用文獻

Ammirato, P.V. (1983) Embryogenesis. In: Handbook of plant cell culture, Vol. 1. Techniques for propagation and breeding. (ed. by Evans, D.A. *et al.*) pp. 82-123. Macmillan, New York, London.

Durham, R.E. and Parrott, W.A. (1992) Repetitive somatic embryogenesis from peanut culture in liquid medium. *Plant Cell Rep.* 11: 122-125.

Hall, R. (1991) The initiation and maintenance of plant cell suspension culture. *Plant Tissue Culture Manual* 3: 1-21.

Halperin, W. (1967) Population density effects in embryogenesis in carrot cell and embryogenesis in carrot cell cultures. *J. Ultrastructure Res.* 18: 428-443.

Huang, H.L., Chen, C.C., Chen, U.C. and Tsay, H.S. (1996) Studies on tissue culture of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. (I) Induction and growth of embryogenic callus from immature embryo. J. Agric. Res. China 45: 156-163.

Ku, J.W. (1982) Studies on tissue culture of *Angelica sinesis* (Oliv.) Diels. *Pharmacognosy Rep.* 17(2): 131-137.

Lai, J.H. (1976) Pharmacognosy. Tsan-yi Publishing Inc., pp. 95-99. Taichung, Taiwan.

Laine, E., Bade, P. and David, A. (1992) Recovery of plant from cryopreserved embryogenic cell suspension of *Pinus caribuea. Plant Cell Rep.* 11: 295-298.

Lee S.C. (1593) Pents'ao-Kang-Mu. pp. 484-487. National Research Institute of Chinese Medi-

cine., Taipei. 1988/

Mei, C.B. (1983) The progress of pharmaceutical studies of *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Chung-T'sao Yiaw* 14(8): 379-382.

Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.

Sharp, W.R., Sondahl, M.R. and Caldas, L.S.(1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hortic. Rev.* 2: 268-310.

Steward, F.C., Mapes, M.O. and Mears, K. (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* 45: 705-708.

Sulaiman, I.M., Rangaswamy, N.S. and Babu, C.R. (1991) Formation of plantlets through somatic embryogeny in the Himalayan blue poppy, *Meconopsis simplicifolia* (Papaveraceae). *Plant Cell Rep.* 9: 582-585.

Tang S.W. (1249) Chung-Hsiu-Cheng-Ho-Pents'ao. p. 199. SMC Publishing Inc., Taipei. 1976.

Yamamoto, O. and Yamada, Y. (1986) Production of reserpine and its optimization in cultured *Rauwolfia serpentina* Benth. cells. *Plant Cell Rep.* 5: 50-53.

Zhang, S. and Cheng, K (1989) *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels: *In vitro* culture, regeneration, and the production of medicinal compounds. In : Biotechnology in agriculture and forestry, Vol. 7. Medicinal and aromatic plants. (ed. by Bajaj, Y. P. S.) pp. 1-22. Springer, Verlag, Berlin, Heidelberg.

收稿日期：85年8月12日

接受刊登日期：85年11月18日

編　　輯：盧虎生

通訊作者：蔡新聲（電話：04-3302301轉108，傳眞：04-3302806或04-3338162）